

HBs S Antigen Quantitative ELISA Kit, Rapid – II 使用手順書

BCL-SHP-21

背景

B 型肝炎ウイルス（HBV）の表面抗原には S 抗原、M 抗原および L 抗原の 3 種類があります。臨床的には、S 抗原は感染者血液中に多いため HBsAg 抗原と同義に使われ、定性的な測定値を元に HBV 感染診断に広く使われています。本キットはこの S 抗原を定量するキットです。

本製品の特徴

1. ヒト血清・血漿中の S 抗原の定量が可能
2. 高感度測定が可能（0.05 nUnit/mL まで検出可能）
3. 2 種の HBsAg 抗体を用いたサンドイッチ法で高い特異性
4. 当社従来品より 20 倍高感度

関連製品のご案内

当社では本キットと関連する製品として以下のものを用意しています。

製品番号	製品名	内容量
BCL-AG-01	B 型肝炎ウイルス表面抗原 L タンパク質 （HBsAg L-protein）	100 µg
	遺伝子組換 HBsAg で S、Pre-S1 、Pre-S2 全部の抗原活性を保有。	
BCL-AGX-02	高活性型 B 型肝炎ウイルス表面抗原 （HBsAg-XT）	100 µg
	HBV 感染患者血清より高い HBsAg 活性を示す非感染性抗原です。	
BCL-S1HP-01	HBs Pre-S1 Quantitative ELISA KIT,Rapid	1 キット
	B 型肝炎表面抗原の Pre-S1 領域検出用の定量キット。迅速測定が可能。	(96well×1plate)
BCL-S2HP-01	HBs Pre-S2 Quantitative ELISA KIT,Rapid	1 キット
	B 型肝炎表面抗原の Pre-S2 領域検出用の定量キット。迅速測定が可能。	(96well×1plate)

HBsAg 関連ではその他の関連製品もあります。詳しくは当社 HP (www.beacle.com)をご覧下さい。

測定原理と測定時間

本キットは S 領域を認識する 2 種の抗体と標準抗原を主要構成成分とするキットです。 固相化抗体でコーティングしたプレートに、標準抗原とサンプルを添加し、検出抗体（HRP 標識）でサンドイッチし、HRP の発色基質を用いて検出する、いわゆるサイドイッチ ELISA 手法を用いています。測定に必要な時間の概略は、試薬調製、サンプリング操作、洗浄操作、吸光度測定などに必要な時間を除き、以下の通りです。

1 段階法：①固相化抗体・検出抗体との反応：60 分間 → ②発色反応：30 分間 (計 90 分)*

2 段階法：①固相化抗体反応：60 分間 →②検出抗体反応：30 分 →③発色反応：30 分間 (計 120 分)

【重要」①急ぐ場合 1 段階迅速法での固相化抗体・検出抗体との反応を 30 分間に短縮できます。(技量にもよりますが感度が多少落ちます)。

②低濃度域での測定値が重要な場合、2 段階法の検出抗体反応を 60 分間に延長するか、反応を室温(25°C前後)ではなく 37°Cで行うようにしてください。なお、37°Cで反応させた場合、プレートリーダーによっては検量線最高濃度で測定装置の上限を超える吸光度が出る場合がありますので、ご注意下さい。

本キットにおける測定値の定義について

Pre-S1 や Pre-S2 抗原領域が結合した L タンパク質や M タンパク質の S 抗原領域は、それらがない S タンパク質のそれとは異なる抗原力価を示します（高次構造の違いと思われる）。そのため本キットではキットに添付の標準抗原の 1 ng/mL の保有する S 抗原力価を 1 nUnit/mL としています。この値は WHO の標準抗原の活性と比較すると凡そ 0.5 ～1.0 IU/mL に相当します。

保存方法と保存安定性

本キットに付属の試薬は全て 4℃で保存下さい。半年は安定です。

キットに付属する試薬等と準備する器具等

キット付属試薬

- 標準抗原（Standard S Antigen）：100 ng（1 本）
- 20 倍濃縮洗浄バッファー (Washing Buffer)：20mL（1 本）
- HRP 標識検出抗体（Conjugate）：6mL（1 本）
- 基質 A（Substrate A）：6mL（1 本）
- 基質 B（Substrate B）：6mL（1 本）
- 停止液 (Stop Solution)：8.5mL（1 本）
- 固相化済 96 穴マイクロプレート（Assay Plate For S Antigen）：1 枚（ストリップ型）
- 取扱説明書：1 部

必要な試薬、器具及び機材など

- マイクロプレートリーダー（測定波長 abs=450nm）
- マイクロチューブ（標準抗原の希釈に用います）
- 8 連マルチチャンネルピペット（同、リザーバー）
- マイクロピペット
- プレートシラー（又はラップ）
- 精製水または蒸留水

実　験　手　順

<準備>

1. 洗浄バッファーの調製： 20 倍濃縮洗浄バッファーを精製水にて 20 倍希釈して下さい。濃縮液は 4℃保存時にしばしば塩の析出物が生じます。希釈時にこれらも完全に溶解されていることをご確認下さい。１×洗浄バッファーは 4℃で保存下さい。
2. 標準抗原の調製： 凍結乾燥抗原チューブへ洗浄バッファーを 1 mL 加え溶かします。凍結乾燥粉末が蓋のほうについている場合もありますので転倒混和してください。得られた抗原溶液は 100nUnit/mL になります。

1 段階法で測定する場合（迅速法）

<①スタンダード調製>

1. チューブを 7 本準備し、それぞれのチューブに①～⑦の番号を付けます。下表に従って、チューブ①に洗浄バッファー900μL を入れます。②～⑦のチューブにも表に示した量の洗浄バッファーを分注します。洗浄バッファー900μL が入ったチューブ①に調製した 100 nUnit/mL の抗原原液を 100 μL 添加しよく混和し、10 nUnit/mL の抗原溶液を調製します。次いで、チューブ②にチューブ①で調製した 10 nUnit/mL の抗原溶液を 500 μL 添加し、5 nUnit/mL の抗原溶液を調製します。以下、同様の手順で、下記に従って抗原溶液の希釈系列を作ります。

STD ID	洗浄バッファー		添加する抗原溶液			希釈後濃度
STD①	900 μL		100 nUnit/mL*	100 μL	を添加	10 nUnit/mL
STD②	500 μL	へ	10 nUnit/mL	500 μL	を添加	5 nUnit/mL
STD③	600 μL	へ	5 nUnit/mL	400 μL	を添加	2 nUnit/mL
STD④	500 μL	へ	2 nUnit/mL	500 μL	を添加	1 nUnit/mL
STD⑤	500 μL	へ	1 nUnit/mL	500 μL	を添加	0.5 nUnit/mL
STD⑥	800 μL	へ	0.5 nUnit/mL	200 μL	を添加	0.1 nUnit/mL
STD⑦	500 μL	へ	0.1 nUnit/mL	500 μL	を添加	0.05 nUnit/mL

*：抗原チューブで調製した抗原原液

2. 検量線を得るために STD①～STD⑦の標準抗原希釈液を用います。別途、ブランク用チューブを用意

して、洗浄バッファーのみを 400 μL 分注します。

＜②サンプルの調製＞

1. サンプルの S 抗原力価が本キットの測定範囲（0.05～10nUnit/mL）になるように洗浄バッファーにて希釈します。サンプルは洗浄バッファーで少なくとも 10 倍以上希釈してください。サンプル中の S 抗原力価が不明の場合には、濃度の異なる複数の希釈サンプルを作ることをお勧めします。
2. ヒト血清・血漿サンプルを測定する場合、洗浄バッファーにて 10 倍に希釈して測定サンプルとしてください。

【ご注意】大量の夾雑タンパク質を含むサンプルの場合、洗浄バッファーで希釈し測定することをお勧めします。

＜③固相化抗体･検出抗体とのワンステップ反応＞

1. アルミ袋に入ったプレートを取り出します。
2. スタンダード用の STD①から STD⑦、ブランク用（洗浄バッファーのみ）を各 3 well に 100μL ずつ分注します（triplicate 測定）。
3. 各測定サンプルも同様に各 3 ウェルに 100μL ずつ分注します。
4. HRP 標識検出抗体溶液を 50μＬずつ 8 連ピペットにより各 well へ分注し、室温（25℃前後）で 1 時間、インキュベーションします。

これ以降は＜④発色試薬の調製＞へお進み下さい。

---

2 段階法で測定する場合（高感度法）

＜①'スタンダード調製＞

1 段階法の＜①スタンダード調製＞に従って下さい。

＜②'サンプルの調製＞

1 段階法の＜②サンプルの調製＞に従って下さい。

＜③'固相化抗体との反応、検出抗体との反応＞

1. アルミ袋に入ったプレートを取り出します。
2. スタンダード用の STD①から STD⑦、各測定サンプル、洗浄バッファーA のみ（ブランク用）を各 3 well に 100μL ずつ分注し（triplicate 測定）、室温（25℃前後）で 1 時間インキュベーションします。
3. 固相化抗体との反応が終わった後、HRP 標識検出抗体溶液を 50μＬずつ 8 連ピペットにより各 well へ分注し、室温で 30 分、インキュベーションします。

これ以降は＜④発色試薬の調製＞へお進み下さい。

＜④発色試薬の調製＞

1. 抗体反応が終了する約 10 分前に発色試薬の調製を始めます。
2. 基質 A と基質 B を 6ml ずつ 8 連ピペット用リザーバーに入れ、混合します。

【ご注意】① 発色用混合液は明るい場所では特に酸化しやすいので暗所に保管し、15 分以内を目処に速やかに御使用下さい。

＜⑤発色反応＞

1. 反応液をデカンテーションの後、ペーパータオルへ叩き付けるようにして除きます。
2. 洗浄バッファー（300μL/well）で 6 回洗浄します。各洗浄の間は 10 秒おいて下さい。洗浄後、プレートをペーパータオルへ叩き付けるようにして、well に残った洗浄液を除きます。
3. 調製した発色試薬を 100μＬずつ 8 連ピペットにより各 well へ分注します。

4. 遮光し、室温で正確に 30 分間、静置します。
5. 発色反応停止液を、発色試薬を入れた時と同じ順番とスピードで 8 連ピペットを用いて 75μL ずつ各 well へ添加し、反応を停止させます。

【ご注意】発色反応後に見られる青色は比較的早く退色します。正確な値を求めるためには、発色反応停止液を加えた後すぐに吸光度を測定するようにしてください。

＜⑥測定と計算＞

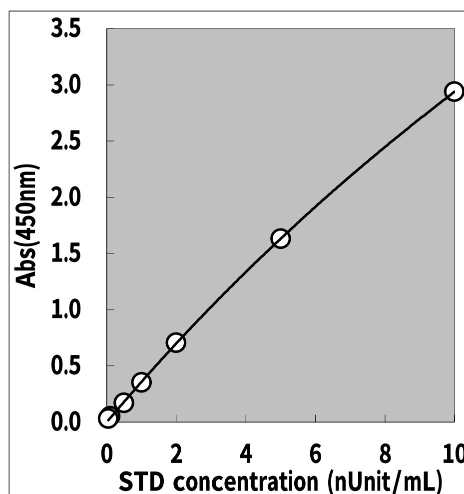
1. 反応停止後直ぐに発色サンプルの入ったプレートをプレートリーダー（吸収波長 450 nm）で吸光度を測定します。
2. 測定した吸光度からブランクで得られた値を引いた値をスタンダードとサンプルの測定値とします。
3. スタンダードの測定値を各スタンダード濃度に対してプロットしプロットに最もフィットする曲線をコンピューターなどによって求めます。通常は 4 パラメーターロジスティック曲線モデルを用います。
4. 得られた曲線式に基づいてサンプルの S 抗原力価を求めてください。
5. 本キットの測定範囲（0.05～10 nUnit/mL）を外れた測定値は採用しないで下さい。

【ご注意】　測定前にプレートの裏面がきれいであることを確認下さい。汚れていると正しい値が得られません。

検 量 線 の 例

下図に、測定例とその検量線を示します。

STD		Abs450nm
ID	nUnit/mL	
STD①	10	2.938
STD②	5	1.631
STD③	2	0.705
STD④	1	0.354
STD⑤	0.5	0.172
STD⑥	0.1	0.051
STD⑦	0.05	0.031



【ご注意】　本測定例は当社内で行って得られた 2 段階法で得られたデータの一例です。実際に測定する場合、測定者の技量やその他の条件によって得られる結果は異なりますので、本キットの性能を保証するものではありません。

問い合わせ先

株式会社ビークル
〒607-8465　京都市山科区上花山坂尻 25-10
TEL:075-585-8505　FAX :075-582-6055
E-mail: technical-support@beacle.com
Website: www.beacle.com

以上